蛍光検出基礎知識⑥ 〜蛍光標識サンプルの画像取込みのコツ

Keyword：**サンプル調製、バックグラウンド**

はじめに

良好な蛍光検出結果を得るにはいくつかのポイントがあります。今回は蛍光標識サンプルの調製や検出機器を使用する際の注意点などをまとめます。

サンプル調製

細心の注意を払ってサンプルを準備することで、バックグラウンドを最小限に抑え画像の品質を向上し感度の改善が可能となります。

■ 蛍光指示薬

ブロモフェノールブルーやキシレンシアノールなどの試薬は、電気泳動の進行状態を追跡するトラッキング色素としてしばしばゲルに添加して使用されますが、検出時にはバックグラウンドの上昇の原因となり不適です。電気泳動状態を確認する必要があれば、トラッキング色素の濃度を最小限に抑えるか、サンプルとは別のレーンに泳動を行うようにしてください。また、サンプルのアプライ状態を確認するだけでよいのであれば、デキストランブルー等のゲル中を移動しない色素を用いることもできます。

■ 蛍光試薬の退光

蛍光物質や蛍光標識サンプルは遮光保存して退光を防ぎます。操作中は、チューブやプレート、サンプルラック等をアルミホイルなどの遮光シートで包んでおきます。

■ 一般試薬の取扱い

蛍光性不純物の混入を防ぐために、純度の高いものを使用してください。アクリルアミドゲル作製時には、アクリルアミド、Ureaはシークエンスグレードのものを使用します。また、蛍光性の粉末の混入を防ぐためパウダーフリーの手袋を使用してください。

■ ストックバッファー

バッファーやゲル中のゴミや不純物はスパイクノイズとして検出され、画像の質や定量性に影響を与えます。バッファーはフィルターをかけてゴミや不純物を取り除き、清潔な容器に入れて保存します。一般試薬は弱い自家蛍光を持っているので分析グレードの使用をおすすめします。ストックバッファーは微生物等の汚染を回避するために、オートクレーブあるいはフィルター滅菌器で処理します。

■ 電気泳動後の蛍光染色用容器

泳動後に蛍光染色を行う際には、染色を妨害しない素材の容器を使用します。SYPROあるいはSYBR系試薬はガラスに吸着する性質があるため、プロピレン製の容器の使用をおすすめします。詳細は使用する各蛍光試薬に添付されている取扱説明書などをご参照ください。

■ サンプル形状

ゲル、メンブレン、ガラスプレート、マイクロタイタープレート等はすべて低い自家蛍光を持っています（図1a）。蛍光検出を行う場合、これらのバックグラウンド蛍光が目的の蛍光シグナルに重なり、検出限界や直線性に影響を与えます。新しい素材の器具や試薬を実験に用いる場合、事前に蛍光性を確認してください。表１に蛍光検出に適したものをまとめました。

■ ゲル作製

ゲル中の気泡は光の散乱を起こし、画像の定量値に影響を与えます。ゲル厚の増加にともなってバックグラウンドは上昇しま

表1. 蛍光検出に適した実験器具

実験器具	製品名／製品特性
メンブレン	Hybond-N+ （核酸用）／ナイロン、＋チャージ
	Hybond-P（タンパク質用）／PVDF、チャージなし
電気泳動用ガラスプレート	無蛍光ガラス
マイクロタイタープレート*	低蛍光性平底ポリスチレンタイプ

＊Corning Costar社またはNalge-Nunc社等よりお求めください。
その他の器具は弊社より販売しております。詳細はバイオダイレクトラインまでお問合せください。

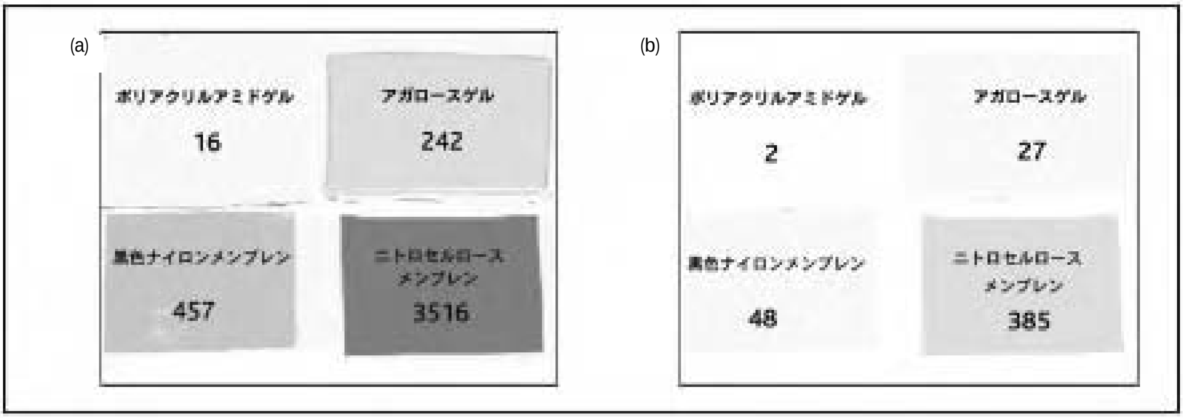


図 1. 各種マトリクスの自家蛍光とバンドパスフィルターを用いたバックグラウンドの低減
４種類のマトリクス（10%ポリアクリルアミドゲル、1%アガロースゲル、黒色ナイロンメンブレン、ニトロセルロースメンブレン）について、それぞれFluorImager内蔵の515 nmロングパスフィルターだけを用いた場合のスキャン結果 (a) と、515 nmフィルターと570DF30バンドパスフィルターを併用した結果 (b) を示しました。測定にはFluorImagerを使用し、PMT（光電増倍管）電圧を650 Vに設定しました。表示値は、それぞれの平均シグナル強度（相対的蛍光強度）を示しています。

す。したがって、ゲル厚は実用範囲内でなるべく薄くしてください。アガロースゲルを準備する場合は、アガロース粒子が残らないように十分に溶かし、水平な容器にキャスティングします。水平でない場所でゲルを作製すると、ゲル厚が一定でなくなるため不均一なバックグラウンドの原因になり、定量値に影響します。プラスチック製のゲルトレイは励起光、蛍光を吸収するため、検出時にはゲルをトレイから外してスキャンを行ってください。

■ ハイブリダイゼーションバッグ

ガラストレイあるいはスキャナーのガラス表面上にサンプルを載せる際には、低蛍光性のハイブリダイゼーションバッグ（ハイブリバッグ）または低蛍光性のラップフィルムを使用しサンプルへの夾雑物付着を防止します。ラップフィルムはポリメチルペンテン樹脂性のものを使用します。

■ 無蛍光ガラスプレート

ガラスプレートに挟んだままでゲルの検出を行う際、サンプル検出がうまくいくかどうかは検出機器の焦点距離の範囲に依存します。使用する検出機器の焦点距離がガラスプレートの厚さに対応していることを確認してください。ガラス表面をチリやケバの出ない布や紙を用いて水拭きします。 汚れが残る場合には75%エタノールで、その後DDWを用いて拭きます。成分中に蛍光物質を含むようなガラスクリーナーは使用しないでください。

■ マイクロタイタープレート

検出にマイクロタイタープレートを使用する場合、低蛍光性で平底のものを使用します。各社から蛍光マイクロタイタープレートリーダー用プレート（Nalge-Nunc社、Corning Costar社製など）が販売されています。

サンプル設置条件

サンプルを検出器に設置する際、バックグラウンドの原因となる気泡や汚れ、夾雑物がないことを確認してください。

■ スキャナーのガラス表面またはガラストレイ

ガラス表面のゴミやバッファーや染色液によるシミ、指紋等はバックグラウンドとなり、画像の質や定量値に影響を与えます。ガラス表面はチリやケバの出ない布や紙を用いて水拭きします。汚れが残る場合には75%エタノールで、その後DDWを用いて拭きます。成分中に蛍光物質を含むようなガラスクリーナーは使用しないでください。アセトンなどの揮発性の有機溶剤は、ガラス表面や周辺部に損傷を与える可能性があるので使用しないでください。

■ 手袋

埃や蛍光性の粉末は画像を取り込む際に光を散乱させます。必ずパウダーフリーの手袋を装着してください。

■ メンブレンの設置

メンブレンは低蛍光性のハイブリバッグまたはラップフィルムに包んだ状態でガラス表面に設置します。このとき、ガラス表面を水で濡らしてからメンブレンやゲルに皺がよらないように設置し、さらに上に水をかけて無蛍光ガラスプレートを被せます。サンプル面を下にして設置面に気泡が入らないように置きます。Typhoonの場合は、3 mm厚の無蛍光ガラスにはさんだ状態で焦点面をスキャナーのガラス表面より3 mm上にして設置します。

■ スペーサー(0.2 ～ 0.4 mm)の使用

ガラスプレートに支持されたサンプルを検出する際には、シークエンサー用のゲルスペーサーやカプトンテープ（Typhoon付属製品）をスキャナーのガラス表面とゲル板の間に置き、その間に水を挟むと光の乱反射を防ぐことができます。また、ガラス表面の損傷を防ぐ効果もあります。

■ サンプルの置き方

弊社スキャナーの場合、ゲルはそのまま設置します。メンブレンの場合はブロット面を下に向けて設置します。設置時には気泡が入らないように注意します。

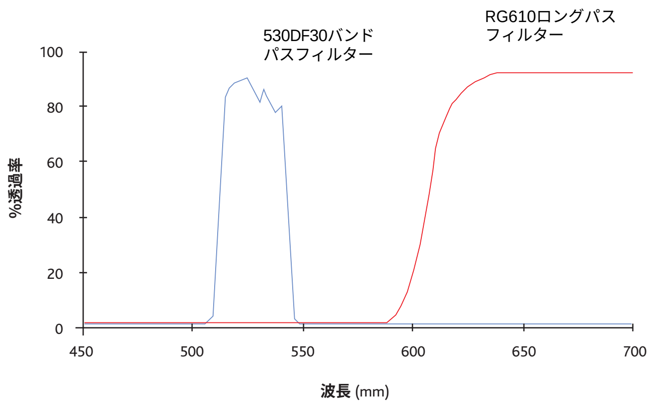


図 2. **フィルターを透過するスペクトルパターン**

フィルターの表面に対して直角に光を入射して波長特性を測定しました。RG610ロングパスフィルターが赤、530DF30バンドパスフィルターが青になります。図のx軸は入射光の波長を示し、y軸はフィルターからの光の透過率を示します。

測定パラメータの設定

蛍光シグナルを最大限に引き出すための方法を以下に示します。

■ 蛍光フィルターによるバックグラウンド消去

サンプルマトリクス（TLCプレート・ゲル・メンブレン等）によるバックグラウンドが広波長域にフラットに出る場合、Band-Pass蛍光フィルターで目的の蛍光物質の波長より短波長あるいは長波長域のバックグラウンドを除くことができます。このタイプのフィルターは目的の波長域の蛍光のみを透過し、それ以外の短波長域と長波長域の蛍光を排除します（図1b、２）。

■ 蛍光フィルターによるレーザー光の削除

集光路にレーザー散乱光をカットする光学フィルターを設置して、サンプルにレーザーを当てる際に出るレーザー散乱光がサンプル蛍光集光時に同時に取り込まれるのを防止します。これにより、サンプル蛍光のみを集光することができ、バックグラウンドを低下させることができます。

■ PMT (photomultiplier tube)ボルテージ

定量的な数値データを得るには、サンプルの蛍光シグナルを使用する機器のダイナミックレンジに合わせる必要があります。蛍光シグナルが強すぎて光飽和を起こした場合、使用機器のダイナミックレンジに合わせてPMT電圧を下げてください。また、シグナルが微弱な場合はPMT電圧を上げることで感度が上がり、定量できる範囲が広がる可能性があります。

■ CCDカメラタイプのレンズ

シグナル強度が強すぎるために機器が光飽和を起こしている場合、サンプル量や蛍光の量を減らすか、レンズの絞りを閉じ、カメラに入る蛍光量の調節をします。シグナル強度が微弱の場合は絞りを開き、取り込む蛍光量を増やします。また、露光時間による感度調節や、Gain（電流増倍率；高くすれば感度は上がりますがノイズも多くなります）によるシグナル増幅率の調節も可能です。



プレビュー画面



コントラスト調整画面

図 3. 画像解析装置の画面の例（Typhoon）

検出機器のメンテナンス

検出機器は常に清潔に保ち、埃がたたず直射日光の当たらない、適切な温度と湿度を維持できる場所に設置します。電気的ノイズを避けるため専用の電源に接続します。その他詳細は各機器の取扱説明書をご参照ください。

画像解析

蛍光標識シグナルをデジタル化した画像は、数値的解析を行う前に、各ピクセルが光飽和を起こしていないかどうか確認する必要があります。また、定量解析を行う際には、バックグラウンドの設定を行うことが非常に重要です。

■ 画像の光飽和の確認

検出機器のコントロールソフトウェア上で、検出時にプレビュー画面（図3）を見ることができるのであれば、その画面で光飽和の有無を確認することができます。また、目的サンプル周辺で光飽和が起きており定量的なデータがとれない場合には、PMT電圧を下げて再度検出を行います。解析ソフトウェア上で本画像を開いた場合、コントラスト調整画面（図3）もしくはピクセルのシグナル値を確認できる機能を用いて光飽和をしているか否かの確認を行うことができます。

※蛍光検出装置のハードウェア、測定原理などの詳細は
milestoneバックナンバーをご参照ください。

http://www.jp.amershambiosciences.com/bdm/imaging/index.asp

GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社
本 社 〒169-0073
東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング
お問合せ：バイオダイレクトライン
TEL : 03-5331-9336 FAX : 03-5331-9370
e-mail : Tech-JP@ge.com
Home Page http://www.gehealthcare.co.jp/lifesciences